抗 c-Myc 标签纳米抗体的筛选与应用

李金晶[1,2]、许菲[1,2]、季艳伟[2,3]、舒梅[2,3]、涂追[3*]、付金衡[2*]

（1. 南昌大学生命科学学院， 江西 南昌 330031；2. 中德联合研究院，江西 南昌 330047；3. 食品科学与技术国家重点实验室，江西 南昌 330047 ）

摘要 目的：以 c-Myc-GST 蛋白为靶分子，从纳米抗体噬菌体展示免疫文库中筛选能够特异性识别 c-Myc 标签（EQKLISEEDL）的纳米抗体。方法：采用固相淘选技术，筛选出能与 c-Myc 标签特异性结合的噬菌体，phage-ELISA 鉴定阳性克隆并测序，通过基因重组技术将阳性噬菌体编码的纳米抗体基因克隆至原核表达载体 pET25b（+），转化至大肠杆菌 *Rosetta*(DE3)，IPTG 诱导表达，SDS-PAGE 分析重组蛋白表达情况。采用间接 ELISA 和量子点免疫荧光法验证纳米抗体的结合活性和特异性。结果：通过 4 轮固相淘选，具有结合活性的噬菌体克隆得到了有效富集，回收率提高了 145 倍，阳性率从 20.83%提高至 85.4%。将 phage-ELISA 鉴定显色值高的两个纳米抗体 A25 和 A26 分别进行了重组表达，SDS-PAGE 结果显示均为可溶性表达，表达量为 60 mg/L。间接 ELISA 结果表明重组蛋白 A25 和 A26 都能够识别 c-Myc 标签，量子点免疫荧光法验证得到纳米抗体 A25 能够对 SP2/0 细胞内的 c-Myc 蛋白进行检测。结论：成功地筛选出与 c-Myc 标签结合的纳米抗体噬菌体克隆，构建了两个抗 c-Myc 标签纳米抗体的原核表达载体并实现了可溶性表达，为检测胞内 c-Myc 蛋白奠定基础。

关键词 纳米抗体；c-Myc；噬菌体展示；ELISA；量子点

Biopanning of anti c-Myc-tag nanobodies and its application for bioimaging

Li Jin-jing[1,2], Xu Fei[1], Ji Yan-wei[2,3], Shu Mei[2,3], Tu Zhui[3*], Fu Jin-heng[2*]

(1 Institute Of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031)

(2 Sino-Germany Joint Research Institute，Nanchang University，Nanchang 330047)

(3 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University，Nanchang 330047)

Abstract Objective: Using c-Myc-GST protein as target molecule, nanobodies that can specifically recognize c-Myc tags (EQKLISEEDL) were screened from phage displayed immune libraries. Methods: Screening of phages specific bingding c-Myc-tag by solid-phase biopanning technology. Positive clones were identified by phage ELISA and then sequenced. The DNA fragment that coded positive nanobody phages were subclone to pET25b（+）vector ,the recombinant expression vector transformed into *E.coli Rosetta* (DE3) cells for expression under induction of IPTG. SDS-PAGE was used to analysis of recombinant protein expression. Finally, the binding activity and specificity of the nanobodies were confirmed by indirect ELISA and quantum dot immunofluorescence technology. Result: After four cycles solid-phase biopanning, phage with binding activity clones were effectively enriched, the recovery rate was improved by 145 times and positive rate increased from 20.83% to 85.4%. The nanobodies A25 and A26 with high OD_{450} in phage-ELISA were recombinantly expressed , the production yield was 60 mg/L. Indirect ELISA results indicate that the recombinant proteins A25 and A26 can recognize the c-Myc-tag.

*通讯作者 电子邮箱：tuzhui@ncu.edu.cn; fujiheng@ncu.edu.cn

Quantum dot immunofluorescence technology results showed that A25 could detect c-Myc protein in SP2/0 cells Conclusion: Anti-c-Myc tagged nanobodies were successfully screened and two prokaryotic expression vector were constructed, the recombinant proteins achieved souble expression. And these laid the foundation for the detection of intracellular c-Myc protein.
Keywords Nanobody; c-Myc; phage display; ELISA; quantum dot

myc 家族是原癌基因家族中一种，其家族成员包括 C-Myc（cell myc）、N-Myc（human neuroblastomas）、L-Myc（small cell lung carcinomas）[1]。其中 c-Myc 是一种常见的易发生突变的基因，基因序列分析发现 c-Myc 有 3 个外显子，外显子 1 不参与编码作用，外显子 2 和 3 编码 439 个氨基酸组成的磷酸蛋白（Genbank No. NP_002458.2）[2, 3]。人 c-Myc 原癌基因位于第 8 号染色体 q24 区带上，它的表达产物与细胞的生长分裂密切相关，c-Myc 基因能刺激细胞的增殖与促进细胞的凋亡[4, 5]。研究发现在众多肿瘤细胞中如乳腺癌、结肠癌、宫颈癌等，c-Myc 均呈现高表达量现象[6-10]。c-Myc 蛋白的检测方法主要包括常规的 ELISA 检测、免疫组化、免疫共沉淀以及新型的电化学免疫检测等技术[11-13]，这些技术依赖于高亲和力与高特异性的抗体，目前最常用的检测 c-Myc 蛋白的抗体大多数为单克隆抗体，纳米抗体（Nanobody，Nb）是一种来源于驼源类动物体内重链抗体的小分子功能性片段，仅由一个重链可变区构成，是目前已知的最小的抗原结合片段[14]，具有分子量小、免疫原性低、稳定性好、易于基因工程改造等优点[15-17]，在医学诊断与治疗方面受到越来越多的关注[18-22]。

在前期工作中，实验室采用带有 c-Myc 标签（EQKLISEEDL）的蛋白免疫羊驼，并成功构建了纳米抗体噬菌体展示免疫文库。本研究以 c-Myc-GST 蛋白作为靶分子，通过固相淘选技术，从纳米抗体噬菌体展示免疫文库中筛选出能与 c-Myc 标签特异性结合的纳米抗体展示噬菌体，并通过基因重组技术在大肠杆菌中进行表达和生物活性检测，为抗 c-Myc 标签纳米抗体的应用奠定基础。

1　材料与方法

1.1 材料与试剂

纳米抗体噬菌体展示免疫文库、M13KO7 辅助噬菌体、大肠杆菌 DH5α、*Rosetta*(DE3)、原核表达载体 pET25b(+)、SP2/0 骨髓瘤细胞株均由本实验室保存；限制性内切酶 *Nco I*、*Not I* 和 T4 DNA 连接酶、质粒小提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒和 PCR 纯化试剂盒购于 TaKaRa 公司；HRP 标记的抗 M13 抗体 GE Healthcare 公司，HRP 标记的抗 His 标签鼠单克隆抗体购自北京鼎国公司，Ni^{2+}-NTA 亲和层析柱购自 Sigma 公司；量子点标记链霉亲和素-605 nm（QDs-SA） 购自武汉咖源量子点技术开发有限责任公司；生物素标记的抗 His 标签单克隆抗体购自北京博奥森生物有限公司；3,3,5,5-四甲基联苯胺（Tetramethylbenzidine，TMB）、异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷（Isopropy-β-D-thiogalactoside，IPTG）以及其他生化试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Multiskan FC 酶联免疫检测仪、Multfuge XIR 低温高速离心机、细胞培养箱、Nanodrop 1000，美国 Thermo 公司，DYY- -I III 稳压电泳北京六一仪器厂，倒置荧光显微镜型号（TE2000，Nikon 公司）。

1.3 实验方法

1.3.1 抗 c-Myc 标签纳米抗体的淘选

参考文献[18]采用固相淘选方法从已构建的纳米抗体噬菌体展示免疫文库进行 4 轮淘选，具体方法如下：1~4 轮包被抗原浓度分别为：100、70、50、30 μg/mL，；，以 3% BSA-PBS 和 3% OVA-PBS 交替作为封闭液，加入 100 μL 噬菌体抗体库（滴度约 1×10^{11} Colony-Forming Units，cfu） PBST（含 0.5% Tween-20）洗涤 3~6 次，PBS 洗涤 10~25 次；再以 100 μL Gly-HCl

溶液（pH=2.2）洗脱特异性结合的噬菌体，加入 35 μL Tris-HCl（pH=8.5）中和洗脱物。取 10 μL 洗脱物测定滴度，余下的洗脱物扩增后用于下一轮淘选。（回收率=洗脱的噬菌体数/投入的噬菌体数；富集度=后一轮噬菌体回收率/前一轮噬菌体回收率）

1.3.2 间接 phage-ELISA 鉴定阳性克隆

分别从第 2~4 轮每轮测定洗脱噬菌体滴度平板上随机挑选 48 个克隆进行鉴定，经辅助噬菌体 M13K07 救援后得到展示纳米抗体噬菌体，采用间接 phage-ELISA 进行阳性克隆鉴定参照文献[18]进行，根据 OD_{450} 值来挑选阳性克隆噬菌体。阳性克隆判断标准为测试样品 450 nm 处吸光值(S)与阴性对照 450 nm 处吸光值(N)的比值 (S/N) ≥1.5。

1.3.3 表达载体 pET25b(+)-Myc-A25、pET25b(+)-Myc-A26 的构建

分别以 pHEN-Myc-A25 、 pHEN-Myc-A26 为模板， 通过 AlpVh-F1（5’-TCGCGGCCCAGGCCGGCCATGGCCCAGKTGCAGCTCGTGGAGTCNGGNGG-3’）、pHEN-R（5’-GCCCCATTCAGATCCTCTTC-3’）为引物，PCR 扩增出目的基因片段；对目的基因与 pET25b(+)表达载体分别用限制性内切酶 *Nco I* 和 *Not I* 进行酶切，DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收酶切产物，将回收的目的基因片段与载体以 1:3 的摩尔比用 T4 DNA 连接酶连接，电转化连接产物至大肠杆菌 DH5α感受态细胞中；采用菌落 PCR 验证转化子，阳性克隆进行测序。

1.3.4 抗 c-Myc 标签纳米抗体的表达与纯化

将重组质粒 pET25b(+)-Myc-A25、pET25b(+)-Myc-A26 转化至表达宿主菌 *Rosetta*(DE3)感受态细胞中；挑取单菌落接种于 5 ml LB-AC(含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 34 μg/mL 氯霉素)的液体培养基中 37 ℃震荡培养过夜；以 1%接种量接种于 50 ml 含 2%葡萄糖的 LB-AC 培养基中，37℃震荡培养至 OD_{600}≈0.6 时向培养物中加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mM，25 ℃振荡培养 6 h；收集培养物 6000 rpm 离心 15 min 后收集菌体,用 1/5 体积 PBS 缓冲液重悬菌体，超声破碎至清亮后 8000 rpm 离心 15 min 收集上清，Ni^{2+}-NTA 柱纯化上清，SDS-PAGE 分析纯化结果。

1.3.5 间接 ELISA 鉴定抗 c-Myc 纳米抗体的活性

5 μg/mL c-Myc-GST 蛋白 100 μL/孔包被于酶标板孔中，PBST 洗板 4 次，4%脱脂乳 37 ℃封闭 2 h，PBST 洗板 4 次后加入 1.3.4 中纯化后的纳米抗体 2.5 μg/mL 100 μL/孔 37 ℃孵育 1 h，PBST 洗板 4 次，100 μL/孔加入 1:5000 HRP 标记的抗 His 标签鼠源单克隆抗体，PBST 洗板 6 次，加入 100 μL/孔反应底物 TMB 显色液，37 ℃孵育 10 min，最后加入 50μL/孔 2M H_2SO_4 终止反应，测定 OD_{450}。

1.3.6 量子点免疫荧光法检测胞内 Myc 蛋白

将处于对数生长期的骨髓瘤细胞株 SP2/0 接种到细胞爬片上置于六孔细胞板中，使细胞长满玻片后加入预冷的丙酮固定 10 min，固定好爬片后用 TBS 缓冲液冲洗数次；加入 1mL 细胞封闭液，37 ℃封闭 15 min，滴加 A25 蛋白溶液 37 ℃孵育 2 h，TBST 冲洗数次后滴加生物素标记的抗 His 标签单克隆抗体，37℃孵育 30min，洗涤数次后加入 1 mL 细胞封闭液封闭 15 min，滴加 QDs-SA 溶液 37 ℃孵育 30 min，洗涤后待细胞爬片完全干燥后滴加封片剂，盖片后在荧光显微镜中观察细胞。

2 结果

2.1 抗 c-Myc 标签纳米抗体的淘选与鉴定

以 c-Myc-GST 融合蛋白为靶分子，从纳米抗体噬菌体展示免疫文库中进行抗 c-Myc 标签纳米抗体的淘选，经过 4 轮固相淘选，每轮以“吸附-洗涤-洗脱-扩增”为基本步骤，靶分子的包被浓度逐步降低，洗涤强度逐步增强来富集特异性抗 c-Myc 标签纳米抗体。通过 4 轮淘选，结果如表 1 所示噬菌体的洗脱量从 7.1×10^5 cfu/mL 增加到 1.0×10^8 cfu/mL，回收率提

高了 145 倍，同时第四轮富集度达 1.94，采用间接 phage-ELISA 从 2~4 轮洗脱滴度平板上鉴定阳性克隆鉴定结果如图 1 所示，阳性率分别为：20.83%、12.5%、85.4%，结果表明随着淘选轮次的增加，特异性针对 c-Myc-GST 蛋白的纳米抗体噬菌体得到了有效的富集。

采用 Clustal W 软件进行多序列对比分析，得到了 11 种抗体序列。经 IMGT 数据库（http://www.imgt.org/）比对序列结果发现，所得到 11 种抗体基因基本属于 IGHV 家族，与文献中报道的 *Lama glama* 抗体基因有较高的同源性。功能分区结果提示，所得到的纳米抗体在 FR 区部分高度同源。将这 11 种纳米抗体噬菌体稀释至同样浓度，间接 phage-ELISA 结果如图 2 所示，克隆 A25 和 A26 显色值较高，采用这两种纳米抗体进行后续的实验。

表 1 亲和淘选对噬菌体的富集

Tab.1 Enrichment of phages in biopanning

轮次	Myc-GST 包被浓度（μg/mL）	噬菌体投入量 (cfu)	噬菌体洗脱量 (cfu)	回收率	富集度
1	100	1.0×10^{11}	7.1×10^{5}	7.1×10^{-6}	—
2	70	1.0×10^{11}	8.7×10^{6}	8.7×10^{-5}	12.25
3	50	1.0×10^{11}	5.3×10^{7}	5.3×10^{-4}	6.09
4	30	1.0×10^{11}	1.0×10^{8}	1.0×10^{-3}	1.94

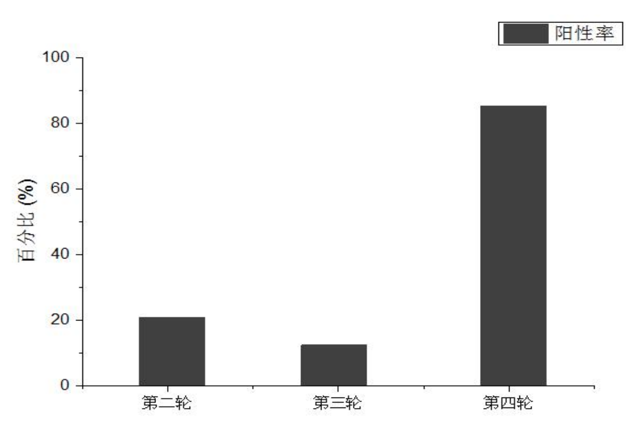


图 1 各轮 phage-ELISA 鉴定特异性阳性克隆结果

Fig.1 The results of the specific positive clones identified by phage-ELISA

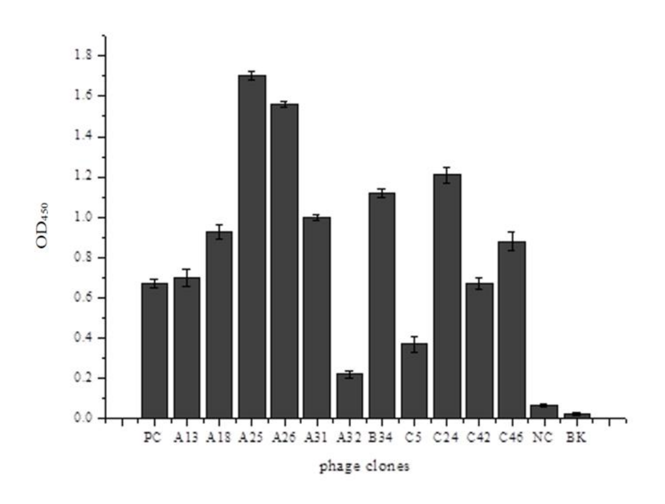


图 2 间接 phage-ELISA 测定阳性噬菌体克隆

Fig.2 Indirect phage-ELISA for positive phage clones（PC: Positive Control; NC: Negative Control; BK: Blank）

2.2 表达载体 pET25b(+)-Myc-A25、pET25b(+)-Myc-A26 的构建与鉴定

按照 1.3.3 的方法构建原核表达载体 pET25b(+)-Myc-A25、pET25b(+)-Myc-A26，阳性克隆的菌落 PCR 验证结果如图 3 所示，在 700 bp 处扩增得到目的条带，初步表明目的基因已转入表达载体，测序结果显示目的片段正确， pET25b(+)-Myc-A25、pET25b(+)-Myc-A26 表达载体构建成功(序列比对图 4 所示)。

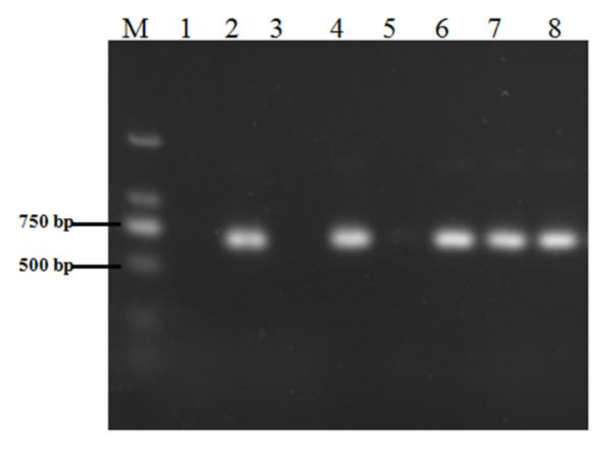


图 3 A25、A26 重组载体菌落 PCR 鉴定

Fig.3 PCR products for recombinant plasmid colony of A25、A26（M: DNA Maker; lanes 1～4: A25 recombinant colonies; Lane 5～8: A26 recombinant colonies）

```
                FR1                 CDR1          FR2           CDR2
A25 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSAS GFAFNLFY MGWVRQAPGKGLEWVAD IDNTGDK-
A26 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS GFPLDNYA IGWLRQAPGKEREGVAC ISNRGGRT
                    FR3                            CDR3
A25 YYAESVEGRFTVSRDNAKKTLYLQMDSLKSEDTAQYYC LKGGCRETFSLCAR---
A26 DYVDSVRGRFTISRDNAKKTVYLQMHNLKPEDTGIYYC VAPEMFRPCKLSSEDVRH
        FR4
A25 -GQGTQVTVSS
A26 WGHGTQVTVSS
```

图 4 纳米抗体氨基酸序列比对

Fig.4 Comparison of the deduced amino acid sequences of nanobodies

2.3 纳米抗体的表达与纯化

将构建好的表达载体转化至大肠杆菌 *Rosetta*（DE3），0.1 mmol/L IPTG 25 ℃诱导表达 6 h，超声破碎后离心收集上清和沉淀，上清经过 Ni^{2+}-NTA 柱纯化后，SDS-PAGE 电泳后得到 20 KDa 左右的目的蛋白（图 5），目的蛋白大小符合预期，经 Nanodrop 1000 定量计算得出重组蛋白表达量达 60 mg/L。

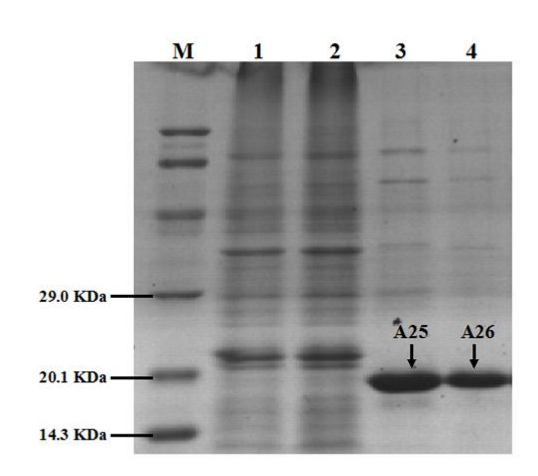


图 5 纳米抗体 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of purification of nanobody（M: protein maker; Lane 1: A25 nickel column flowthrough; lane 2: A26 nickel column flowthrough; lanes 3-4: nickel column purified protein）

2.4 纳米抗体 A25、A26 的活性分析

本文中使用的纳米抗体噬菌体展示免疫文库是通过用 c-Myc-BSA 人工抗原对羊驼进行免疫后所制备的免疫文库，在筛选过程中以 c-Myc-GST 为靶蛋白，目的是为了筛选出针对 c-Myc 标签蛋白的纳米抗体噬菌体。间接 ELISA 分析纳米抗体活性，包被 c-Myc-GST 和 GST 蛋白分别测定与 A25、A26 纳米抗体的结合活性(图 6)，两种纳米抗体与 GST 蛋白的结合活性明显低于 c-Myc-GST，表明两种纳米抗体能与 c-Myc 蛋白特异性结合；同时 A25 与 c-Myc-GST 蛋白的结合活性要高于 A26。

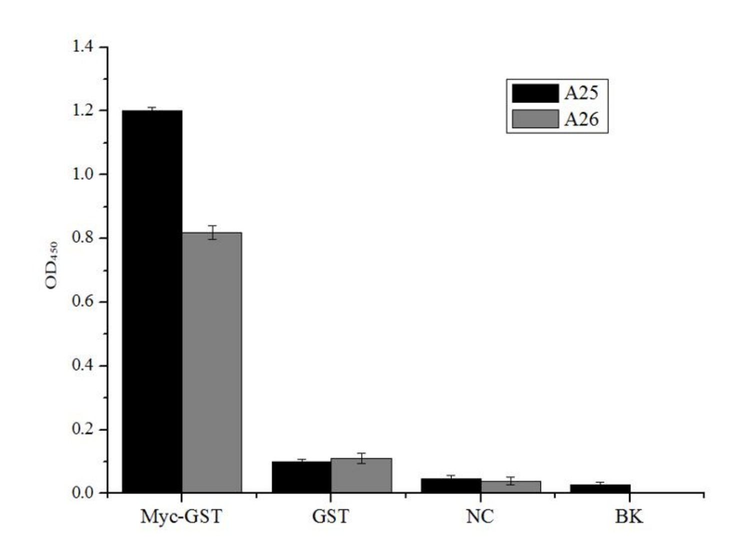


图 6 间接 ELISA 测定目的蛋白

Fig. 6 Indirect ELISA for the protein（NC: Negative Control; BK: Blank）

2.5 量子点免疫荧光法对胞内 Myc 蛋白特异性检测

将制备好的细胞爬片倒置于荧光显微镜下观察，结果如图 7 所示 SP2/0 细胞爬片加入 A25 纳米抗体实验组（B）中，荧光激发后视野中的细胞均发射红色荧光，且在细胞外区域没有发生非特异性结合（A 图是在白光下成像结果）；而在没有加入 A25 纳米抗体的对照组(D)中无明显荧光被捕获（C 图是在白光下成像结果）。进而表明只有添加 A25 纳米抗体，量子点才能识别 SP2/0 细胞，才会使细胞产生荧光激发现象，结果表明抗 c-Myc 标签纳米抗体能特异性的与 SP2/0 胞内 c-Myc 蛋白结合。

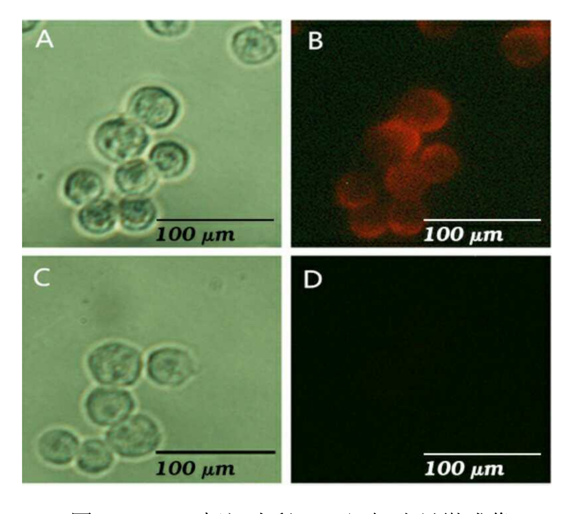


图 7 QDs-SA 标记小鼠 SP2/0 细胞显微成像

Fig. 7 QDs-SA-labeled mouse SP2/0 imaging

3 讨论

通常情况下原癌基因维持着较低的表达量或者不表达，但在某些因素的作用下导致原癌基因表达异常，细胞会逐步转化为恶性细胞最终导致细胞癌变。在正常细胞分裂的过程中 c-Myc 基因的表达很低，然后在癌细胞中其表达量较高，在原发肿瘤和晚期伴有扩散肿瘤中发现了 c-Myc 扩增的现象[6]。研究发现在大肠癌恶性肿瘤中 c-Myc 的表达量明显高于其他正常组织，抑制 c-Myc 的表达在一定程度上可以抑制癌细胞的分裂[23]。对于癌症细胞的检测很容易发现 c-Myc 基因与其产物的异常表达，因此建立 c-Myc 蛋白的检测方法对肿瘤的早

期发现与治疗具有普遍的意义。c-Myc 蛋白的免疫学检测依赖于高亲和力抗体，常规的免疫组化、免疫共沉淀、酶联免疫吸附法等检测方法中大多使用单克隆抗体，然而单抗的筛选与制备过程冗长，同时由于单抗分子量大，组织穿透性差，不利于作为检测探针实现胞内 c-Myc 蛋白的定位检测。

纳米抗体具有高水溶性与稳定性、低免疫原性、组织穿透性强、易表达的优点致使其广泛的应用于医学诊断、药物开发、食品安全检测等方面[24-26]。本研究从纳米抗体噬菌体展示免疫文库筛选出两种能与 c-Myc-GST 蛋白特异性结合纳米抗体噬菌体（A25、A26），通过基因重组技术构建了 pET25b(+)原核表达载体，并在大肠杆菌 *Rosetta*（DE3）中实现了可溶性表达，间接 ELISA 验证了两种纳米抗体都能与 c-Myc-GST 蛋白特异性结合，同时通过量子点标记技术成功的对 SP2/0 细胞内的 c-Myc 蛋白进行了检测，研究结果为 c-Myc 靶向检测与治疗奠定基础。

参考文献 ：

[1] BAYLISS R, BURGESS S G, LEEN E, et al. A moving target: structure and disorder in pursuit of Myc inhibitors [J]. Biochemical Society Transactions, 2017, 45(3):709-17.
[2] BATTEY J, MOULDING C, TAUB R, et al.The human c-myc-oncogene-structural consequences of translocation into IgH locus in burkitt-lymphoma[J]. Cell, 1983, 34(3): 779-87.
[3] DAVIS A C, WIMS M, SPOTTS G D, et al. A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice[J]. Genes & Development, 1993, 7(4): 671-82.
[4] KHALEGHIAN M, SHAKOORI A, RAZAVI A E, et al. Relationship of Amplification and Expression of the C-MYC Gene with Survival among Gastric Cancer Patients [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2015, 16(16): 7061.
[5] INCASSATI A, CHANDRAMOULI A, EELKEMA R, et al. Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: β-catenin [J]. Breast Cancer Research Bcr, 2010, 12(6): 213.
[6] PELENGARIS S, KHAN M, EVAN G. c-MYC: More than just a matter of life and death [J]. Nature Reviews Cancer, 2002, 2(10): 764-76.
[7] YANG X H, TANG F, SHIN J, et al. A c-Myc-regulated stem cell-like signature in high-risk neuroblastoma: A systematic discovery (Target neuroblastoma ESC-like signature) [J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 41.
[8] HABERL S, HAFERLACH T, STENGEL A, et al. MYC rearranged B-cell neoplasms: Impact of genetics on classification [J]. Cancer Genetics, 2016, 209(10): 431-9.
[9] SZABO A G, GANG A O, PEDERSEN M O, et al. Overexpression of c-myc is associated with adverse clinical features and worse overall survival in multiple myeloma [J]. Leukemia & Lymphoma, 2016, 57(11): 2526-34.
[10] WANG W, DENG J, WANG Q, et al. Synergistic role of Cul1 and c-Myc: Prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer [J]. Oncology Reports, 2017, 38(1): 245-52.
[11] LI P, SHI J-X, DAI L-P, et al. Serum anti-MDM2 and anti-c-Myc autoantibodies as biomarkers in the early detection of lung cancer [J]. Oncoimmunology, 2016, 5(5):
[12] ZHOU S L, YUE W B, FAN Z M, et al. Autoantibody detection to tumor-associated antigens of P53, IMP1, P16, cyclin B1, P62, C-myc, Survivn, and Koc for the screening of high-risk subjects and early detection of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Diseases of the Esophagus, 2014, 27(8): 790-7.

[13] HE J-L, TIAN Y-F, CAO Z, et al. An electrochemical immunosensor based on gold nanoparticle tags for picomolar detection of c-Myc oncoprotein [J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2013, 181：835-841.

[14] BEGHEIN E, GETTEMANS J. Nanobody Technology: A Versatile Toolkit for Microscopic Imaging, Protein–Protein Interaction Analysis, and Protein Function Exploration [J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8.

[15] WANG H, MENG A M, LI S H, et al. A nanobody targeting carcinoembryonic antigen as a promising molecular probe for non-small cell lung cancer [J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 16(1): 625-30.

[16] HUSSACK G, HIRAMA T, DING W, et al. Engineered Single-Domain Antibodies with High Protease Resistance and Thermal Stability [J]. Plos One, 2011, 6(11): e28218.

[17] SAERENS D, CONRATH K, GOVAERT J, et al. Disulfide Bond Introduction for General Stabilization of Immunoglobulin Heavy-Chain Variable Domains [J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 377(2): 478-88.

[18]刘夏，许杨，涂追,等．抗 AFB_1 单域重链抗体文库淘选方法的研究[J]．食品与生物技术学报, 2011, 30(6):950-955.

[19] MUYLDERMANS S, BARAL T N, RETAMOZZO V C, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology [J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 2009, 128(1-3): 178.

[20] RAHBARIZADEH F, AHMADVAND D, SHARIFZADEH Z. Nanobody; an old concept and new vehicle for immunotargeting [J]. Immunological Investigations, 2011, 40(3): 299.

[21] DETALLE L, STOHR T, PALOMO C, et al. Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection [J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2016, 92(1): AAC.01802-15.

[22] KEYAERTS M, XAVIER C, HEEMSKERK J, et al. Phase I Study of 68Ga-HER2-Nanobody for PET/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Carcinoma [J]. Journal of Nuclear Medicine, 2015, 57(1): 27.

[23] DE M T, MUYLDERMANS S, DEPICKER A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools [J]. Trends in Biotechnology, 2014, 32(5): 263.

[24] SUN B C, ZHAO S W, LIU D G. Expression and implication of Ki67 and P53 protein in laryngeal carcinoma [J]. Beijing Medical Journal, 2007, 29(10):577-9.

[25] OLIVEIRA S, HEUKERS R, SORNKOM J, et al. Targeting tumors with nanobodies for cancer imaging and therapy [J]. Journal of Controlled Release Official Journal of the Controlled Release Society, 2013, 172(3): 607-17.

[26] JOPLING H M, ODELL A F, PELLET-MANY C, et al. Endosome-to-Plasma Membrane Recycling of VEGFR2 Receptor Tyrosine Kinase Regulates Endothelial Function and Blood Vessel Formation [J]. Cells, 2014, 3(2): 363-85.

[27] LIU X, XU Y, WAN D-B, et al. Development of a Nanobody-Alkaline Phosphatase Fusion Protein and Its Application in a Highly Sensitive Direct Competitive Fluorescence Enzyme Immunoassay for Detection of Ochratoxin A in Cereal [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(2): 1387-94.